

## IMMUNOSUPPRESSIVE AGENT

**Publication number:** JP63233917

**Publication date:** 1988-09-29

**Inventor:** SUZUKI KAZUO; HOSOKAWA TOMOHIDE

**Applicant:** COSMO KAIHATSU KK

**Classification:**

- international: **C07H17/07; A61K31/35; A61K31/352; A61K31/70; A61K31/7028; A61K31/7042; A61K31/7048; A61P37/06; C07D311/30; C07H15/26; C07H15/26; C07H17/00; A61K31/35; A61K31/352; A61K31/70; A61K31/7028; A61K31/7042; A61P37/00; C07D311/00; C07H15/00; C07H15/00; (IPC1-7): A61K31/35; A61K31/70; C07D311/30; C07H17/07**

- european:

**Application number:** JP19870067798 19870324

**Priority number(s):** JP19870067798 19870324

**Report a data error here**

### Abstract of JP63233917

**PURPOSE:**To obtain an immunosuppressive agent, containing a flavonoid compound or a glycoside thereof as an active ingredient, having effects on inhibition of propagation of T cells and differentiation of killer T cells by antibody production and mixed lymphocyte cultivation and useful for transplantation immunity, etc. **CONSTITUTION:**An immunosuppressive agent, containing a flavonoid compound expressed by the formula (R1-R9 may be same or different and are H, OH or OCH3) or a glycoside thereof as an active ingredient. For example, myricetin, morin, kaempferol, fisetin, dastiscetin, scutellarein, chrysoeriol, etc., are cited as the flavonoid compound expressed by the formula. Glucoside, galactoside, fructoside, etc., are cited as the glycoside. Any of flavonoid compounds and glycosides thereof which are separated and purified from natural plants or chemically synthesized may be used as the flavonoid compound or glycoside thereof which is the above-mentioned active ingredient.

---

Data supplied from the **esp@cenet** database - Worldwide

⑫ 公開特許公報 (A)

昭63-233917

⑤ Int. Cl. <sup>4</sup>	識別記号	庁内整理番号	④ 公開	昭和63年(1988)9月29日
A 61 K 31/35	A B C	7330-4C		
		7431-4C		
// C 07 D 31/30		7430-4C		
C 07 H 17/07		7417-4C	審査請求	未請求 発明の数 1 (全5頁)

⑤④発明の名称 免疫抑制剤

②特 願 昭62-67798

②出 願 昭62(1987)3月24日

②発	明	者	鈴木	和男	神奈川県横浜市金沢区泥亀町1丁目22番5号
②発	明	者	細川	友秀	京都府京都市左京区一乗寺東閉川原町19
①出	願	人	コスモ	開発株式会社	東京都港区芝浦1丁目1番1号
③代	理	人	弁理士	八木田 茂	外2名

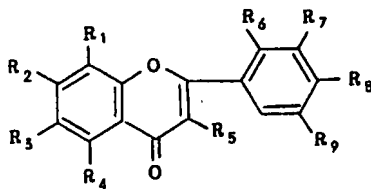
明 細 書

4. 発明の名称

## 免疫抑制剂

## 1 特許請求の範囲

一股式：

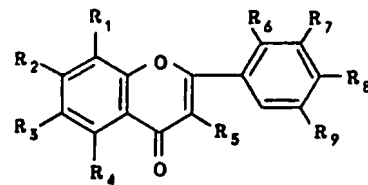


(式中、 $R_1$  ないし  $R_9$  は同一でも異なつてもよくかつそれぞれ  $-H$ 、 $-OH$  または  $-OCH_3$  を示す)で表わされるフラボノイド化合物又はこれらの配糖体を有効成分とする免疫抑制剤。

### 3 発明の詳細な説明

### 産菜上の利用分野

本発明は、一般式



(式中  $R_1$ 、 $R_2$  は  $-H$ 、 $-OH$ 、 $-OCH_3$  を示す)  
で表わされるフラボノイド化合物又はこれらの配糖体を有効成分とする免疫抑制剤に関するものである。

## 従来の技術及び問題点

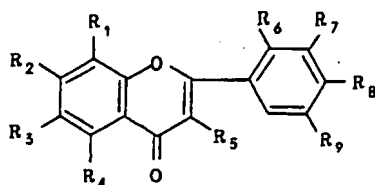
最近有効な免疫抑制剤として、サイクロスポリンAが使用されはじめ、従来のアザチオプリンとプレドニゾロンの併用法に比べ、移植臓器の生存率がさらに改善されている。しかしながら、サイクロスポリンAの使用に伴う合併症は少なくない。特に、サイクロスポリンAの使用による腎障害の多発が新たな問題となつている〔たとえば臨床免疫、第14巻、第837頁(1982)参照〕。今後腎移植などをはじめとする臓器移植に対する期待は

ますます高まると考えられ、それゆえさらに副作用の少ない、有効な拒絶反応抑制剤を開発する必要があつた。

#### 問題点を解決する手段、作用及び効果

本発明者らは、フラボノイド化合物又はこれらの配糖体が試験管内 (in vitro) の研究において、抗体産生、リンパ球混合培養によるT細胞の増殖とキラーT細胞の分化を抑制する効果を有し、移植免疫などに適用可能な免疫抑制剤であることを見出し、本発明を完成するに至つた。

本発明に用いるフラボノイド化合物は構造式：



(式中  $R_1$ 、ないし  $R_9$  は同一でも異なつてもよくかつそれぞれ  $-H$ 、 $-OH$  または  $-OCH_3$  を示す) を有するものである。これらのフラボノイド化合物と

たとえばアロ抗原に対する細胞障害性T細胞の生成抑制、遅延型過敏症に関与するエフェクター細胞の生成抑制、ナチュラルキラー細胞、リンホカイン活性化キラー細胞の生成抑制、インターロイキン-2、インターロイキン-3などのリンホカイン生成及び放出の抑制、リンパ球混合反応 (MLR) の抑制などがある。また移植片から宿主への免疫反応の抑制としては、例えば移植片対宿主免疫反応 (GVHR) の抑制がある。

#### 実施例

以下実施例により本発明をさらに説明する。

##### 実施例1

BXSB / MpJ マウス (6ヶ月令、雌及び雄) の脾細胞とマイトマイシンC処理した BALB / C マウスの脾細胞を混合し、種々の濃度のミリセチンと共に5日間培養し、アロキラーT細胞生成反応に及ぼすミリセチンの効果を調べた。

培養条件は BXSB 脾細胞  $5 \times 10^6$  と BALB / C 脾細胞  $5 \times 10^5$  を各穴に入れ、2 ml の5% ウシ胎仔血清、2 mM の L-グルタミン、 $5 \times 10^{-5} M$  の

しては、たとえばミリセチン、モリン、ケンフェロール、フィセチン、マチスセチン、ロピネチン、ヘルバセチン、ケルセタゲチン、ヒピスチン、フラボン、プラトール、クリシン、アピゲニン、アカセチン、ルテオリン、ジオスメチン、スクテラレイン、クリソエリオールなどが挙げられる。またこれらの配糖体を形成する糖成分はいずれのものでもよく、たとえば配糖体としてはグルコシド、ガラクトシド、フルクシド、ラムノシド、ラムノグルコシド、アラビノシド、キシロシド、ルチノシドなどが挙げられる。

これらのフラボノイド化合物及びその配糖体は天然の植物から分離精製したものであつても、化学的に合成したものであつても、同等の免疫抑制活性を有している。

本発明の免疫抑制剤は特に移植免疫反応の抑制に有効であり、免疫担当細胞の機能抑制、すなわちエフェクター細胞の生成を抑制する。宿主から移植片に対する拒絶反応の抑制効果としては、た

2-メルカプトエタノールを添加した RPMI 1640 培養液にて  $37^\circ C$ 、5% 炭酸ガス-95% 空気下で培養した。ミリセチンは培養開始時点で添加し、生成した BALB / C アロ抗原 (H-2d) を認識するアロキラーT細胞の活性を以下の方法で測定した。H-2d 抗原をもつ P 815 マストサイトマ細胞を  $^{51}Cr$  でラベルし、その  $10^4$  個を5日間培養した BXSB 細胞  $3 \times 10^5$  個と混合し、96穴マイクロプレートで  $37^\circ C$ 、4時間培養した後、アロキラーT細胞により破壊された P 815 細胞から遊離される  $^{51}Cr$  量を測定し、破壊活性を  $^{51}Cr$  量の相対値で表現した。この計算式はつぎのとおりである。

$$(^{51}Cr \text{ 遊離率}) \% = \frac{\text{ミリセチン存在下の遊離} - \text{自発遊離}}{\text{ミリセチン非存在下の遊離} - \text{自発遊離}} \times 100$$

結果を表1に示す。これらの結果が示すとおり、ミリセチン濃度  $9.1 \times 10^{-3}$  ないし  $9.1 \times 10^{-2} \mu g / ml$  ではやゝアロキラー細胞生成を増強する効果が認められたが、 $9.1 \mu g / ml$  では強力なア

ロキラー細胞生成反応の抑制が認められた。

表 1

ミリセチン濃度 ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )	$^{51}\text{Cr}$ 遊離率(%)	
	BXSB マウス(雄)	BXSB マウス(雌)
0	65.2	65.6
$9.1 \times 10^{-4}$	67.4	66.8
$9.1 \times 10^{-3}$	65.2	75.2
$9.1 \times 10^{-2}$	71.1	77.0
$9.1 \times 10^{-1}$	58.6	70.7
9.1	10.5	11.3

実施例 2

実施例 1 のミリセチンに代えて、各種のフラボノイド化合物を用い、これらの添加濃度  $9.1 \mu\text{g}/\text{ml}$  におけるアロキラー T 細胞生成反応に及ぼすフラボノイド化合物の効果を調べた。

この結果を表 2 に示す。

表 2

フラボノイド化合物	$^{51}\text{Cr}$ 遊離率(%)	
	BXSB マウス(雄)	BXSB マウス(雌)
無添加	66.4	66.1
ケルセチン	10.3	11.1
フィセチン	11.4	10.8
ケンフエロール	10.2	11.0
ダウズセチン	11.2	12.1
ロビンチン	12.5	12.7
モリン	13.6	14.4
ヘルパセチン	13.5	14.0
ケルセタダチン	20.1	21.2
ヒピスセチン	18.5	18.7
ケンフエリド	15.6	15.5
ラムネチン	16.2	16.2
イソラムネチン	14.1	14.8
ラムナジン	16.2	18.3
タンプレチン	15.1	16.2
フラボン	14.6	15.5
クリシン	11.3	12.4
アピゲニン	15.8	17.1
アカセチン	12.3	14.2
ジオスメチン	13.7	14.8
スクララレイン	14.5	15.8

## 実施例 3

実施例 1 のミリセチンに代えて、各種のフラボノイド化合物の配糖体を用い、これらの添加濃度  $9.1 \mu\text{g}/\text{ml}$  におけるアロキラー T 細胞生成反応に及ぼすフラボノイド化合物の効果を調べた。

この結果を表 3 に示す。

表 3

フラボノイド化合物配糖体	$^{51}\text{Cr}$ 遊離率(%)	
	BXSB マウス(雄)	BXSB マウス(雌)
無添加	65.2	66.4
イソケルシトリン	18.4	18.6
ルチン	17.1	17.6
ミリスチリン	19.2	19.1
ゲチスシン	16.2	16.6
ナルシシン	15.4	16.8
ゲクチリン	14.8	15.7
ヒピスチリン	13.1	14.4
トリンギン	14.6	15.4
コスモシニン	16.4	17.3
ジオスミン	14.5	16.4

## 実施例 4

BXMB / MpJ マウス (6ヶ月令、雌及び雄) の脾細胞とマイトマイシン C 処理した BALB / C マウスの脾細胞  $2 \times 10^5$  個を 96 穴マイクロプレートの各穴に入れ、0.2 ml の 5% ウシ胎仔血清、2 ml の L-グルタミン、 $5 \times 10^{-5}\text{M}$  の 2-メルカプトエタノールを添加した RPMI 1640 培養液にて  $37^\circ\text{C}$ 、5% 炭酸ガス-95% 空気下で 3 日間培養後、各穴に 0.2  $\mu\text{Ci}$  (キュリー) の  $^3\text{H}$ -チミジンを加えて 2 時間培養し、セルハーベスターで細胞を回収し、 $^3\text{H}$ -チミジンの細胞内への取り込み量 (壊変毎分、d.p.m. と表示する) を測定し、DNA 合成の程度を調べた。

この結果を表 4 に示す。ミリセチンの濃度が  $9.1 \times 10^{-1} \mu\text{g}/\text{ml}$  で DNA 合成の抑制効果が認められはじめ、 $9.1 \mu\text{g}/\text{ml}$  では顕著な抑制効果が認められた。

## 実施例 5

BXSB / MpJ マウス (4ヶ月令、雌) の脾細胞  $5 \times 10^5$  個と  $^{51}\text{Cr}$  ラベルした YAC-1 リンホーマ細胞 (マウス NK 細胞の標的細胞) 10 個を混合し、種々の濃度のミリセチンと共に 96 穴マイクロプレートで  $37^\circ\text{C}$ 、4 時間培養後、NK 細胞により破壊された YAC-1 細胞から遊離された  $^{51}\text{Cr}$  量を測定することにより、NK 細胞の標的細胞破壊反応活性に及ぼすミリセチンの効果を調べた。NK 活性の強さを表現する計算式は実施例 1 の式を用いた。

この結果を表 5 に示す。ミリセチンの濃度  $0.5 \mu\text{g}/\text{ml}$  以上で NK 活性の抑制効果が認められた。

表 4

ミリセチン濃度 ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )	$^3\text{H}$ -チミジン取り込み量 (d.p.m.)			
	BXSB マウス (雄)		BALB/C 刺激細胞	
	BALB/C	0	$2 \times 10^5/\text{well}$	$2 \times 10^5/\text{well}$
0	10936	10127	33136	39643
$9.1 \times 10^{-4}$	10329	11551	34496	40298
$9.1 \times 10^{-3}$	9868	9294	36687	44726
$9.1 \times 10^{-2}$	8973	9917	28328	37826
$9.1 \times 10^{-1}$	9447	9405	19981	37531
9.1	9141	8914	15437	20505

表 5

ミリセチン濃度 ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )	$^{51}\text{Cr}$ 遊離率 (%)
0	$10.4 \pm 1.3$
0.125	$10.3 \pm 1.1$
0.25	$10.9 \pm 1.0$
0.5	$8.7 \pm 0.7$
1.0	$8.1 \pm 0.8$
1.25	$6.8 \pm 0.5$

## 実施例 6

実施例 6 のミリセチンに代えて、各種のフラボノイド化合物及びその配糖体を用い、これらの添加濃度  $1.25 \mu\text{g}/\text{ml}$  における NK 細胞の標的細胞破壊反応に及ぼす効果を調べた。この結果を表 6 に示す。



表 6

フラボノイド化合物 及び配糖体	$^{51}\text{Cr}$ 遊離率 (%)
無添加	$10.8 \pm 1.1$
ケルセチン	$7.0 \pm 0.8$
ケンフエロール	$6.5 \pm 0.6$
ダチスセチン	$7.2 \pm 0.9$
ラムネチン	$6.8 \pm 0.5$
イソケルシトリン	$6.5 \pm 0.6$
ルチン	$7.1 \pm 0.6$
ダクチリン	$6.1 \pm 0.8$
クリシン	$6.2 \pm 0.7$
アピゲニン	$6.9 \pm 0.6$
ジオスメチン	$7.5 \pm 0.7$
トリンヤン	$6.5 \pm 0.5$
コスモシイン	$7.5 \pm 0.8$
ジオスミン	$7.6 \pm 0.8$

## 実施例 7

実施例 1 と同じ条件で 5 日間のリンパ球混合培養を行ない、生成する抗 H-2<sup>d</sup> (BALB/C) T<sub>DTH</sub> 細胞の活性を調べた。T<sub>DTH</sub> 活性はフレンチを BALB/C 脾細胞  $1 \times 10^7$  個と培養細胞  $3 \times 10^6$  個を混合し、30  $\mu\text{L}$  のイーグル MEM 培養液に懸濁し、BALB/C マウスの足蹠に注射し、24 時間後の足蹠の肥厚をノギスで測定した。遅延型過敏症反応の程度を足蹠の肥大で評価した。

ミリセチン濃度  $1.0.0 \mu\text{g}/\text{ml}$  で著明な T<sub>DTH</sub> 生成反応の抑制が認められた。

ミリセチン濃度 ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )	注入	足蹠の肥厚 ( $\Delta\text{mm}$ )
0	-	$0.923 \pm 0.095$
0	+	$1.300 \pm 0.040$
0.1	+	$1.449 \pm 0.060$
0.5	+	$1.945 \pm 0.088$
1.0	+	$1.328 \pm 0.055$
2.5	+	$1.165 \pm 0.133$
5.0	+	$1.362 \pm 0.110$
10.0	+	$1.079 \pm 0.034$